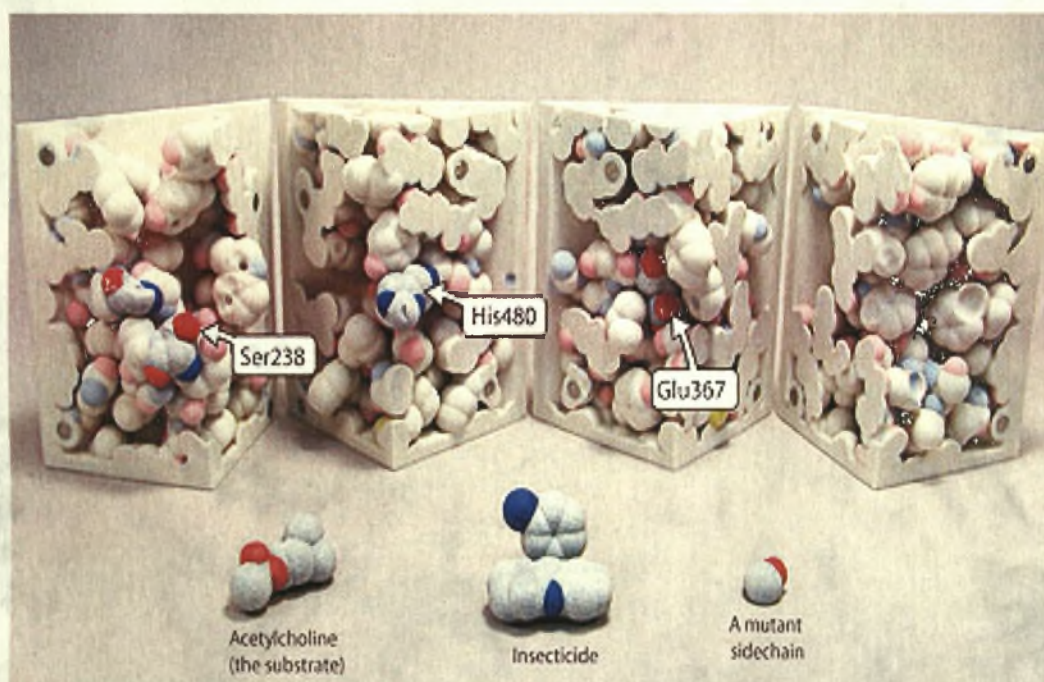




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΣΑΓΡΗ Χ. ΕΥΘΥΜΙΑ

**ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ
ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ.**



ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7002/1
Ημερ. Εισ.: 19-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
634.639
ΣΑΓ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087335

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**Εξάπλωση μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του
δάκου της ελιάς σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2. ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

3. ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία διεξήχθη στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Λάρισα. Το αντικείμενο της μελέτης είναι η εξάπλωση της μετάλλαξης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης της ακετυλοχολινεστεράσης (BoaceΔ3Q) που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα του δάκου της ελιάς (*Bactocera oleae*) σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή κ. Ματθίοπουλο Κωνσταντίνο για την τιμή που μου έκανε να με δεχθεί στο εργαστήριο του και να μου παρέχει την άρτια επιστημονική του γνώση, τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την βοήθεια κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής.

Επίσης, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κα. Κακάνη Ευδοξία για την πολύτιμη βοήθεια της για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Η συμπαράσταση καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και οι γνώσεις που μου παρείχε στο εργαστηριακό κομμάτι ήταν καθοριστικές όπως επίσης και η βοήθεια κατά την συγγραφή της διατριβής συνέβαλλαν στην επιτυχή τέλεση της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης και την υποψήφια διδάκτορα Τσουμάνη Κωνσταντίνα για την συμπαράσταση της στο εργαστήριο καθώς και τους Αυγουστίνο Αντώνη, Ζυγουρίδη Νίκο και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και την ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που αποτελεί την κινητήρια δύναμη σε ότι έχω κάνει στην μέχρι τώρα πορεία μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	6
1. Η ελιά	6
1.1 Προσβολές της ελιάς	8
2. Ο δάκος της ελιάς	10
2.1 Μορφολογία και βιολογικός κύκλος του δάκου	11
2.2 Προκαλούμενες ζημιές στον ελαιόκαρπο	13
2.3 Διαχείριση- καταπολέμηση του δάκου	14
3. Η δημιουργία ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα	16
3.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων	17
3.2 Η Ακετυλοχολινεστεράση.	18
3.3 Δάκος και ανθεκτικότητα	20
4. Σκοπός	22
<u>5.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	23
5.1 Έντομα	23
5.2 Απομόνωση του γενετικού υλικού από τα έντομα (Fly preps)	24
5.3 Ενίσχυση PCR του εξονίου X	26
5.4 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού	29
5.5 Ηλεκτροφόρηση	31
<u>6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	33
6.1. Έλεγχος παρουσίας μετάλλαξης	33
6.2. Πληθυσμιακή ανάλυση	36
<u>7.ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	40
<u>8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί τον βασικότερο εχθρό για την ελιά στις χώρες γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου. Η προκαλούμενη ζημιά μπορεί να φτάσει το 50-60 % της παραγωγής των ελαιοδέντρων. Τα τελευταία χρόνια όλες οι προσπάθειες καταπολέμησης του γινότανε μέσω χημικών ουσιών με αποτέλεσμα το έντομο λόγω επιλογής να αποκτήσει ανθεκτικότητα κυρίως στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και να είναι εμφανής μέσω μεταλλάξεων στο νευρικό του σύστημα. Συνολικά στον δάκο έχουν βρεθεί τρεις μεταλλάξεις: δύο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης και μια μικρή έλλειψη στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Boace Δ3Q).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εξάπλωση της μετάλλαξης Boace Δ3Q σε φυσικούς πληθυσμούς δάκου σε περιοχές τις λεκάνης της Μεσογείου. Συνολικά μελετήθηκαν 241 δάκοι από 8 διαφορετικές περιοχές. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας έδειξαν εξάπλωση της συγκεκριμένης μετάλλαξης ωστόσο όμως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν στο θέμα της ανθεκτικότητας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Η ΕΛΙΑ

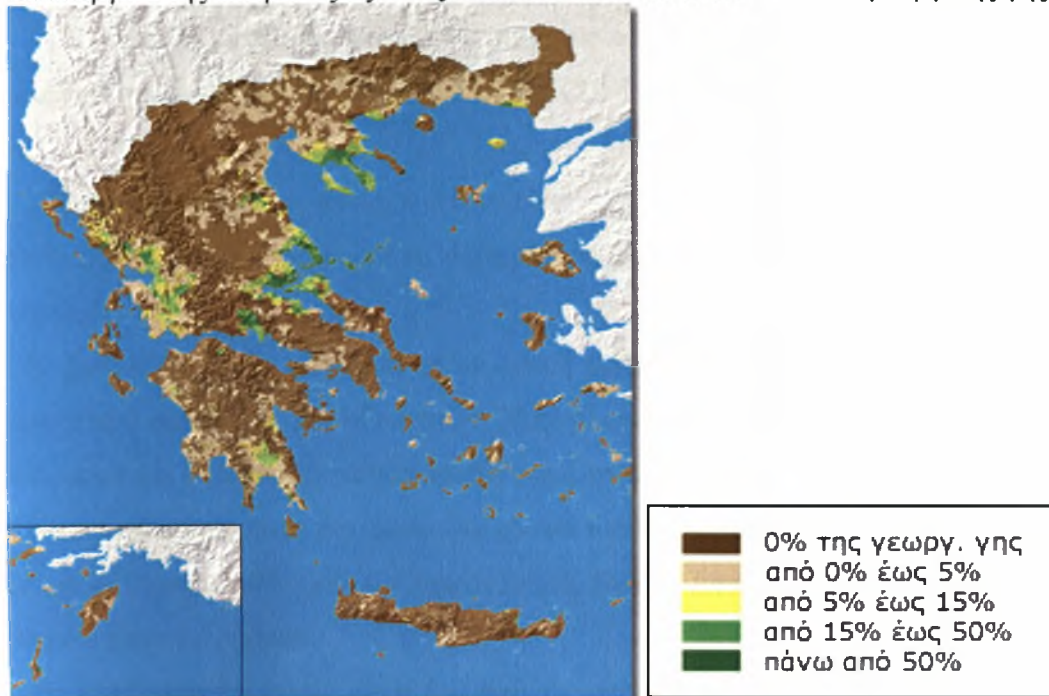
Η ελιά (*Olea europaea* L.) αποτελεί αναμφίβολα από πολύ παλιά ένα δέντρο σημαντικής αξίας καθώς με το πέρασμα του ανά τους αιώνες κατόρθωσε να συντηρήσει ολόκληρους λαούς και να αποτελεί πηγή ζωής για τον άνθρωπο μέχρι και σήμερα. Αποτέλεσε ακόμη και πηγή έμπνευσης για μεγάλους δημιουργούς της τέχνης όπως τα έργα «Olive Trees» και «the Olive Grove» του Vincent van Gogh (1889) (Εικ.1,2).



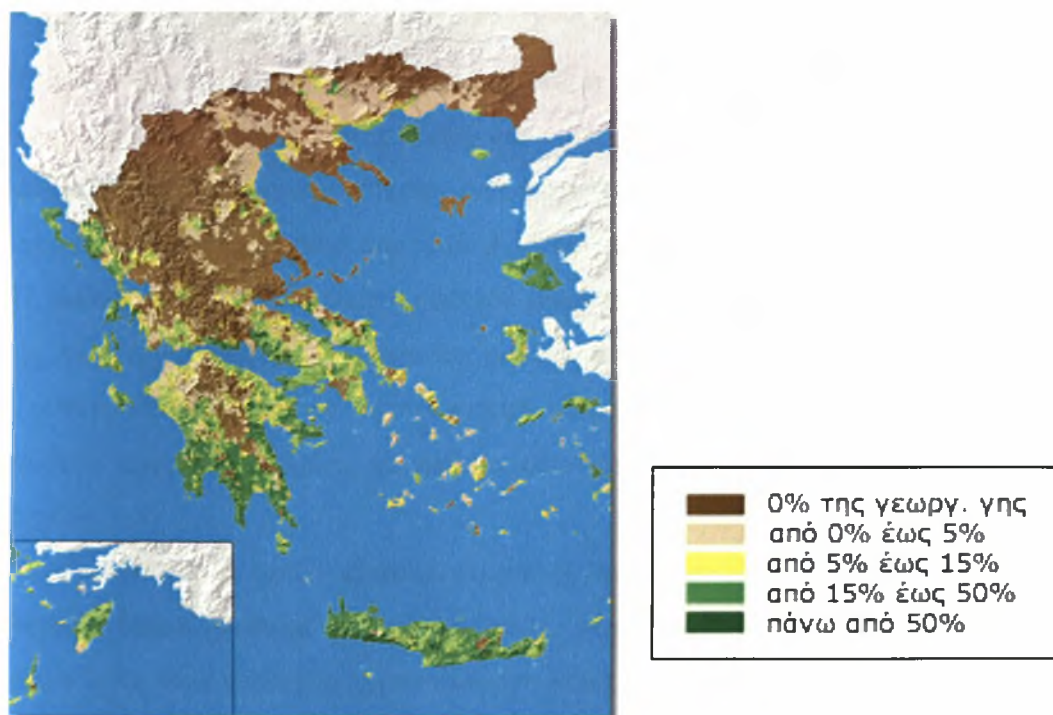
Εικόνες 1,2: Τα έργα «Olive Trees» και «the Olive Grove» του Vincent van Gogh.

Σε ολόκληρη την υφήλιο υπάρχουν περίπου 810 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε σύνολο 97.000.000 στρεμμάτων. Το 95% των ελαιοδέντρων βρίσκεται στην Μεσόγειο και στη χώρα μας το ποσοστό τους είναι περίπου 14,5-15.0%. Η ελιά κατατάσσεται σε δύο κατηγορίες: επιτραπέζια ή βρώσιμη ελιά και ελαιοποιήσιμη ή ελιά παραγωγής ελαιολάδου. Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης, στην Ελλάδα η επιτραπέζια ελιά κατέχει έκταση 1.386 χιλιάδων στρεμμάτων επί της συνολικής γεωργικής γης που είναι 38.037 χιλιάδες στρέμματα. Δηλαδή το ποσοστό κάλυψης της γεωργικής γης είναι 3,6% (Εικ.3). Η παραγωγή της επιτραπέζιας ελιάς είναι 257 χιλιάδες τόνοι. Αντίστοιχα, το ποσοστό κάλυψης της γεωργικής γης από τις ελαιοποιήσιμες ελιές είναι 17,5% κατέχοντας έκταση 5.289 χιλιάδων στρεμμάτων και η παραγωγή τους ανέρχεται στους 1.947 χιλιάδες τόνους (Εικ.4).(Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων-www.minagric.gr).

Εικόνα 3: Ο χάρτης απεικονίζει περιοχές Δημοτικών Διαμερισμάτων, στα οποία η καλλιέργεια της επιτραπέζιας ελιάς καλύπτει τα ακόλουθα ποσοστά γεωργικής γης



Εικόνα 4: Ο χάρτης απεικονίζει περιοχές Δημοτικών Διαμερισμάτων, στα οποία η καλλιέργεια της ελαιοποιήσιμης ελιάς καλύπτει τα ακόλουθα ποσοστά γεωργικής γης



1.1 ΠΡΟΣΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά είναι ευπαθές δένδρο σε μύκητες αλλά και σε έντομα. Οι κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες (Παναγόπουλος Χ.Γ. 1997, Ελένα Κ. 2000, Μαλαθράκης Ν.Ε. 2005) είναι:

- Η **βερτισιλλίωση** της ελιάς, η οποία είναι αδρομύκωση οφειλόμενη στον μύκητα *Verticillium dahliae*. Αποτελεί τη σοβαρότερη μυκητολογική ασθένεια του εδάφους της ελιάς.
- Η **βούλα**, η οποία είναι μία πολύ κοινή ασθένεια της ελιάς στην Ελλάδα και γενικότερα στον χώρο της Μεσογείου. Προκαλείται από τον μύκητα *Camarosporium dalmatica* και παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1883 από τον Von Thumen.
- Η **ευτυπίωση** η οποία αποτελεί μία χρόνια ασθένεια που προσβάλλει τα αγγεία του ξύλου και προκαλείται από τον ασκομύκητα *Eutypa lata*. Συχνά αναφέρεται και ως νέκρωση των βραχιόνων.
- Το **κυκλοκόνιο** η οποία είναι μια από τις σπουδαιότερες ασθένειες της ελιάς και προκαλείται από τον μύκητα *Cycloconium oleaginum* συν. *Spiloceia oleagina*. Ο μύκητας προσβάλλει κυρίως τα φύλλα του δέντρου, μπορεί όμως να παρουσιαστούν προσβολές και στα κλαδιά, στους ποδίσκους των ανθέων και στους μίσχους των φύλλων.
- Η **φόμα** η οποία αποτελεί χρόνια ασθένεια που ανήκει στην κατηγορία των αδρομυκώσεων, δηλαδή είναι ασθένεια των ξυλωδών αγγείων. Η ασθένεια προκαλείται από τον μύκητα *Phoma incompta*. Τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα είναι η προοδευτική μαρανση των νέων βλαστών που στη συνέχεια ξηραίνονται.
- Το **ωίδιο**, το οποίο προκαλείται από τον μύκητα *Leveillula taurica* που ανήκει στην τάξη των Ασκομυκήτων. Η εγγενής μορφή του όμως είναι σπάνια και έτσι οι μολύνσεις γίνονται από την αγενή μορφή του που είναι ο *Oidiopsis taurica*. Το παθογόνο προσβάλλει κυρίως τα φύλλα και συγκεκριμένα εκείνα της βάσης του βλαστού.
- Το **γλοιοσπόριο** το οποίο προκαλείται από το παθογόνο αδηλομύκητα *Gleosporium olivarium*. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Πορτογαλία από τον Almeida. Σήμερα όμως είναι διαδεδομένη σε διάφορα μέρη του κόσμου όπως στην λεκάνη της Μεσογείου, στην Αμερική, στην Ιαπωνία κτλ. Ο μύκητας προσβάλλει τόσο τις

επιτραπέζιες όσο και τις ελαιοποιήσιμες ποικιλίες, κυρίως όμως προσβάλει ώριμους καρπούς. Η ασθένεια είναι γνωστή και σαν «παστέλα», ενώ στην Ιταλία την αποκαλούν «λέπρα της ελιάς».

Ωστόσο, οι προσβολές της ελιάς από έντομα είναι εκείνες που προκαλούν τη μεγαλύτερη ζημιά με τον δάκο (*Bactocera oleae*) να αποτελεί την βασικότερη «απειλή» για την ελιά.

2. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Ο δάκος (Εικ.5) αποτελεί το σοβαρότερο εχθρό της ελιάς σε όλες τις χώρες της Μεσογείου όπου καλλιεργείται η ελιά, γεγονός που κυρίως οφείλεται στο ότι είναι είδος μονοφάγο. Δηλαδή, κατά τη διάρκεια ενός σταδίου του βιολογικού του κύκλου (προνύμφη) ζει και αναπτύσσεται μόνο στο ζωντανό μεσοκάρπιο της ελιάς και της αγριελιάς. Προκαλεί σοβαρή ζημία στη σάρκα του ελαιοκάρπου και αν δεν ληφθούν έγκαιρα τα κατάλληλα προφυλακτικά μέτρα, οι απώλειες είναι δυνατό να υπερβούν το 30% της ολικής παραγωγής (Chaniotakis, 1994). Η προκαλούμενη ζημία είναι κυρίως ποσοτική, γιατί η παραγωγή μειώνεται, αφού ο δάκος καταστρέφει αρκετό σαρκώδες μέρος του ελαιοκάρπου και ποιοτική επειδή η ποιότητα του παραγόμενου ελαιολάδου υποβαθμίζεται με την αύξηση της οξύτητας του.



Εικόνα 5: Ενήλικο άτομο του δάκου (Bactocera oleae)

2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Ο δάκος της ελιάς (στο παρελθόν *Dacus oleae*) ανήκει στην τάξη Diptera, την οικογένεια Tephritidae και το γένος *Bactrocera*. Η εν λόγω οικογένεια αποτελεί μία σχετικά νέα οικογένεια των διπτέρων που εμφανίστηκε πριν από περίπου 50 εκατομμύρια χρόνια. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει περίπου 5.000 είδη μεταξύ των οποίων και τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" ("fruit flies"), μέλος της οποίας αποτελεί και ο δάκος της ελιάς.

Ο δάκος είναι από τα μικρότερα είδη στο γένος. Το ακμαίο είναι μια μύγα που το μήκος του σώματος της φθάνει 4-5 mm, με κεφαλή ξανθοκίτρινη με δύο κηλίδες μαύρες κάτω από τις κεραίες και με σύνθετους οφθαλμούς με πράσινες μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας έχει χρώμα κιτρινοκαφέ, ενώ η κοιλία είναι καστανοκίτρινη. Τα φτερά είναι διαφανή και στην κορυφή παρουσιάζουν μια μικρή καστανή κηλίδα (Εικ.6). Το αυγό είναι ελλειψοειδές επίμηκες, λευκό και με μήκος 0.8 mm. Η προνύμφη φθάνει μέχρι και τα 6-7mm σε μήκος (3ο στάδιο) και είναι υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη ενώ το βομβύκιο έχει σχήμα κυλινδρικό με μήκος 4-5 mm και χρώμα λευκό στην αρχή που με την πάροδο των ημερών γίνεται καστανοκίτρινο (Rice, 2000).



Εικόνα 6: Τέλεια έντομα δάκου, αριστερά είναι το αρσενικό και δεξιά βρίσκεται το θηλυκό έντομο. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα που διαχωρίζει τα δύο φύλα είναι ο ωοθέτης που διακρίνεται εμφανώς στον θηλυκό δάκο. Ο ωοθέτης έχει το βασικό του τμήμα μαύρο και μήκος 1mm.

Ο δάκος αναπαράγεται 3 - 5 φορές κάθε χρόνο, δηλαδή ο κύκλος ζωής του με τα διάφορα στάδια (αυγό – προνύμφη – βομβύκιο - τέλειο έντομο (μύγα)) επαναλαμβάνεται 3-5 φορές το χρόνο. Αυτό εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που υπάρχει ελαιόκαρπος πάνω στα ελαιόδεντρα και από τις καιρικές συνθήκες (Weems , 1999). Για την ανάπτυξη του δάκου η μέση ημερήσια θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 24°C, ούτε να είναι κάτω από 9°C. Όταν οι θερμοκρασίες υπερβούν τους 35°C και είναι παρατεταμένες, μειώνονται οι πληθυσμοί του εντόμου, λόγω θνησιμότητας του. Επίσης, μειώνεται η δραστηριότητα και η γονιμότητα του.

Εκτός των θερμοκρασιών, η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία ευνοεί τη δράση και την ανάπτυξη του δάκου. Ο δάκος διαχειμάζει στο στάδιο του βομβυκίου στο έδαφος. Είναι δυνατό όμως να το συναντήσουμε κρυμμένο και αδρανοποιημένο σε ρωγμές του φλοιού των δέντρων στο στάδιο του τελείου εντόμου σε περιοχές με ήπιο χειμώνα. Συνήθως από τον Ιούνιο όπου οι θερμοκρασίες το επιτρέπουν, το βομβύκιο μεταμορφώνεται σε τέλειο έντομο. Μετά την σύζευξη και αφού ξυλοποιηθεί ο πυρήνας της ελιάς και παρέλθουν οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, το θηλυκό τέλειο έντομο εναποθέτει ένα ή περισσότερα αυγά πάνω στον ελαιόκαρπο. Κάθε θηλυκό γεννά περίπου 250 αυγά. Τα αυγά εκκολάπτονται στη συνέχεια σε προνύμφη. Η προνύμφη αφού τραφεί ικανοποιητικά κινείται προς την επιδερμίδα του καρπού και δημιουργεί ένα κοίλωμα όπου και νυμφώνεται, δηλαδή φτιάχνει το βομβύκιο ώστε από αυτό να προκύψει το τέλειο έντομο και να ολοκληρωθεί με αυτόν τον τρόπο ο κύκλος ζωής του εντόμου (1 γενεά). Οι καλοκαιρινές γενεές νυμφώνονται στον ελαιόκαρπο και κατά το φθινόπωρο η προνύμφη τελικού σταδίου διανοίγει οπή στο καρπό της ελιάς όπου πέφτει στο έδαφος για να νυμφωθεί σε βάθος μερικών εκατοστών (Weems, 1999). Η προνύμφη τρέφεται αποκλειστικά από τον ελαιόκαρπο, ενώ αντίθετα τα τέλεια έντομα τρέφονται από τα μελιτώδη εκκρίματα των δέντρων.

2.2 ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΕΣ ΖΗΜΙΕΣ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ

Ο δάκος της ελιάς, είναι το σημαντικότερο παράσιτο των ελαιώνων στη νότια Ευρώπη, Ασία, και Αφρική, καθώς προκαλεί σοβαρές οικονομικές απώλειες λόγω των μειωμένων παραγωγών και της μειωμένης ποιότητας των καρπών και του λαδιού. Η ζημία προκαλείται από την απόθεση των αυγών και την διόρυξη στους καρπούς των αναδυόμενων προνυμφών (Εικ.7). Το μεγαλύτερο μέρος της καταστροφής είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης της προνύμφης στο εσωτερικό της ελιάς η οποία τρεφόμενη καταστρέφει το σαρκώδες μέρος του ελαιοκάρπου με αποτέλεσμα τη μείωση του βάρους του και τη πρόωρη πτώση του. Με τον τρόπο αυτό ο καρπός γίνεται ακατάλληλος για κονσερβοποίηση και γενικά για διάθεσή του στο εμπόριο, ενώ το λάδι που παράγεται από τους προσβεβλημένους καρπούς παρουσιάζει υψηλή οξύτητα λόγω της αποσύνθεσης του καρπού από τους μύκητες που αναπτύσσονται. Παράλληλα, όμως, η οπή οωτοκίας του δάκου (νύγμα ωοτοκίας) είναι υπεύθυνη για τη προσβολή : α. από το μύκητα *Camarosporium dalmaticum* που προκαλεί την “ξεροβούλα” στις άγουρες και τη “σαποβούλα” στις ώριμες ελιές και β. από το μύκητα Μακροφώμα (*Macrophoma dalmatica*) που δημιουργεί μαύρες νεκρωτικές κηλίδες στον καρπό (Παναγόπουλος, 1997).



Εικόνα 7: Καρποί της ελιάς προσβεβλημένοι από τον δάκο.

2.3 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ- ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Υπάρχουν δύο κατηγορίες καταπολέμησης του δάκου: η χημική καταπολέμηση και η βιολογική καταπολέμηση. Η αντιμετώπισή του δηλαδή γίνεται με χημικά μέσα (δολωματικοί ψεκασμοί με εντομοκτόνα), με βιοτεχνικά μέσα (παγίδες με ελκυστικά τροφής) και βιολογικά μέσα (ωφέλιμα παρασιτοειδή έντομα).

Αν και έχει γίνει προσπάθεια να υιοθετηθούν οι βιολογικές μέθοδοι, στη διαχείριση του δάκου, οι χημικές ουσίες παραμένουν το κύριο εργαλείο ελέγχου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι δολωματικοί ψεκασμοί από αέρος ή από εδάφους και οι ψεκασμοί καλύψεως. Οι δολωματικοί ψεκασμοί από εδάφους προκαλούν λιγότερες παρενέργειες στο οικοσύστημα απ' αυτούς που εφαρμόζονται από αέρος. Το κόστος βέβαια εφαρμογής είναι σημαντικά μεγαλύτερο λόγω του κόστους εργασίας και του συγχρονισμού επεμβάσεων σε μεγάλη έκταση. Στην Ελλάδα, οι οικονομικές απώλειες που προέρχονται από το δάκο υπολογίζονται ετησίως στο 30% της συνολικής παραγωγής και το κόστος του χημικού ελέγχου του εντόμου υπολογίστηκε σε 32 εκατομμύρια ευρώ κάθε έτος. Ωστόσο όμως, το συνολικό όφελος από την δακοκτονία ανέρχεται στα 550 εκατομμύρια ευρώ (www.minagric.gr). Στη λεκάνη της Μεσογείου, για περισσότερο από τρεις δεκαετίες ο έλεγχος έχει βασιστεί στην εντατική χρήση του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου dimethoate, λόγω της χαμηλής υπολειμματικότητας του στο ελαιόλαδο, αν και πρόσφατα έχει παρατηρηθεί στροφή προς τα πυρεθροειδή και τη μακροκυκλική λακτόνη Spinosad, ειδικά στις δυτικές ευρωπαϊκές χώρες (Hawkes et al., 2005). Στη βιβλιογραφία τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αναφέρονται και ως οργανοφωσφορούχες ενώσεις ή οργανοφωσφορικοί εστέρες. Η κατηγορία των εντομοκτόνων αυτών περιέχει περισσότερα από κάθε άλλη ομάδα που κυκλοφορεί στη διεθνή αγορά (Τζανακάκης, 1995).

Η παγίδευση χρησιμοποιήθηκε πολύ στο παρελθόν και χρησιμοποιείται και σήμερα, τόσο ως άμεσο όσο και ως έμμεσο μέτρο καταπολέμησης. Για ορισμένα έντομα η παγίδευση αρκεί για να τα καταπολεμήσει, ενώ για τα πιο πολλά αποτελεί βοηθητικό ή συμπληρωματικό μέτρο. Διάφορα ερεθίσματα (χημικά, οπτικά ή άλλα) ελκύουν το έντομο στην παγίδα, απ' όπου δεν μπορεί να διαφύγει και στη συνέχεια θανατώνεται. Στις τροφικές παγίδες περιλαμβάνονται οι δακοπαγίδες ή γυάλινες παγίδες τύπου McPhail (Εικ.8). Στο κάτω μέρος τους βρίσκεται ελκυστικό υγρό με

αποτέλεσμα, τα έντομα που εισέρχονται στην παγίδα να έχουν μικρή πιθανότητα να διαφύγουν και τελικά να πνίγονται σε αυτό. Το κύριο μειονέκτημα των περισσότερων τροφικών παγίδων είναι ότι χρειάζονται ανανέωση του ελκυστικού υγρού κάθε λίγες ημέρες και δεν έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα (Τζανακάκης, 1995).

Ως κυριότεροι φυσικοί εχθροί του δάκου αναφέρονται τα παρασιτοειδή Υμενόπτερα *Eupelmus urozonus* Dalm., *E. martellii* Masi, *Pnigalio mediterraneus* Ferr. & Del., *Eurytoma martellii* Dom., *Cyrtotypx latypes* Rond και *Opius concolor* Szepi. Εκτός από τα παρασιτοειδή αυτά, ως φυσικοί εχθροί του δάκου αναφέρονται και άλλα είδη όπως το αρπακτικό των αυγών *Prolasioptera berlesiana* Paoli (*Cecidomyiidae*) και διάφορα *Dermaptera*, *Scolopendridae*, *Lithobiidae*.



Εικόνα 8 : παγίδα McPhail

Μια από τις πιο επιτυχημένες μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης είναι η τεχνική απελευθέρωσης στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT), η οποία βασίζεται στη μαζική εκτροφή και επαναλαμβανόμενη απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων. Τα θηλυκά έντομα στη φύση που ζευγαρώνουν με τα στείρα αρσενικά δεν αφήνουν απογόνους, με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση του πληθυσμού. Στον δάκο παλαιότερα είχε γίνει προσπάθεια καταπολέμησης με την συγκεκριμένη τεχνική αλλά υπήρξε ανεπιτυχής διότι τα στείρα αρσενικά έντομα είχαν διαφορετική ώρα ζευγαρώματος σε σύγκριση με τα άγρια θηλυκά (Economopoulos, 1972).

3. Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Υπάρχει έντονη ανησυχία για την πρόσφατη αύξηση της χρήσης φυτοφαρμάκων όχι μόνο για οικοτοξικολογικούς λόγους αλλά και γιατί η αύξηση αυτή έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται μέσω της επιλογής γενετικών χαρακτηριστικών τα οποία προϋπάρχουν φυσιολογικά σε έναν πληθυσμό και όχι μέσω της δημιουργίας νέων γνωρισμάτων. Δηλαδή, όταν ένας πληθυσμός εκτεθεί σε μία ποσότητα εντομοκτόνου, το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων θα θανατωθούν, ενώ θα υπάρξουν και κάποια άτομα, τα οποία θα επιβιώσουν λόγω της ύπαρξης ανθεκτικών αλληλομόρφων σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους. Τα άτομα αυτά θα δώσουν απογόνους, οι οποίοι θα φέρουν το γνώρισμα της ανθεκτικότητας. Με τον τρόπο αυτό το ποσοστό των ανθεκτικών ατόμων θα γίνεται όλο και μεγαλύτερο με τη πάροδο των γενεών, ώστε σε σύντομο χρονικό διάστημα ολόκληρος ο πληθυσμός θα απαιτεί υψηλότερες δόσεις εντομοκτόνου για να καταπολεμηθεί.

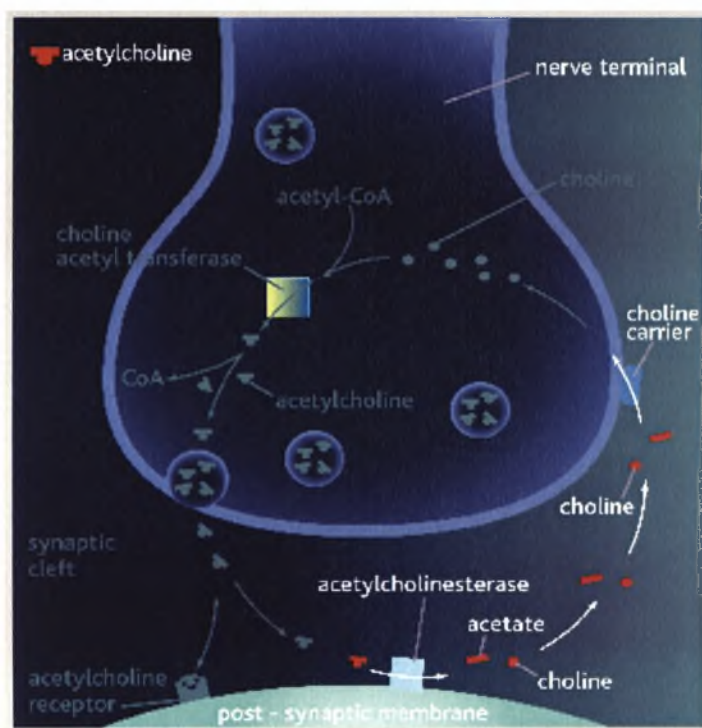
3.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ

Γενικά η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένο μεταβολισμό του εντομοκτόνου είτε σε τροποποίηση του στόχου δράσης του εντομοκτόνου. Στην περίπτωση της ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά πρόκειται για την τροποποίηση του στόχου δράσης τους, την ακετυλοχολινεστεράση. Δηλαδή, έχουμε μεταλλάξεις οι οποίες βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα να αλλάζουν την διαμόρφωση του κατά τέτοιο τρόπο ώστε δεν επιτρέπουν την πρόσδεση του εντομοκτόνου σε αυτό. Ενώ αντίθετα η ακετυλοχολίνη συνεχίζει να προσδένεται κανονικά.

Ο κύριος τρόπος της τοξικής δράσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στα έντομα και τα άλλα ζώα είναι η παρεμπόδιση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (όπως και τα καρβαμιδικά) αποτελούν στην ουσία υποστρώματα για το ένζυμο AChE, αντιδρούν δηλαδή μαζί του με τρόπο ανάλογο της ακετυλοχολίνης. Δημιουργούν πρώτα σύμπλοκο με το ένζυμο, μετά το φωσφορυλιώνουν και ακολουθεί με βραδύ ρυθμό η αποφωσφορυλίωση, που μπορεί να διαρκέσει και μήνες. Η φωσφορυλίωση γίνεται με ηλεκτρονιόφιλη προσβολή του ατόμου P σε ένα OH της σερίνης του ενζύμου. Η δέσμευση αυτή της AChE έχει ως συνέπεια την περίσσεια ακετυλοχολίνης με αποτέλεσμα πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος που οδηγεί σε υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, σπασμούς, παράλυση και τελικά σε θάνατο του εντόμου (Ware, 1989). Ορισμένα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δεν είναι ισχυροί παρεμποδιστές του ενζύμου στην τεχνικώς καθαρή τους μορφή και στα σκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά. Μέσα όμως στο σώμα των εντόμων ενεργοποιούνται, δηλαδή μετατρέπονται συνήθως με οξείδωση, σε ισχυρούς παρεμποδιστές του ενζύμου (Τζανακάκης, 1995).

3.2 Η ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ

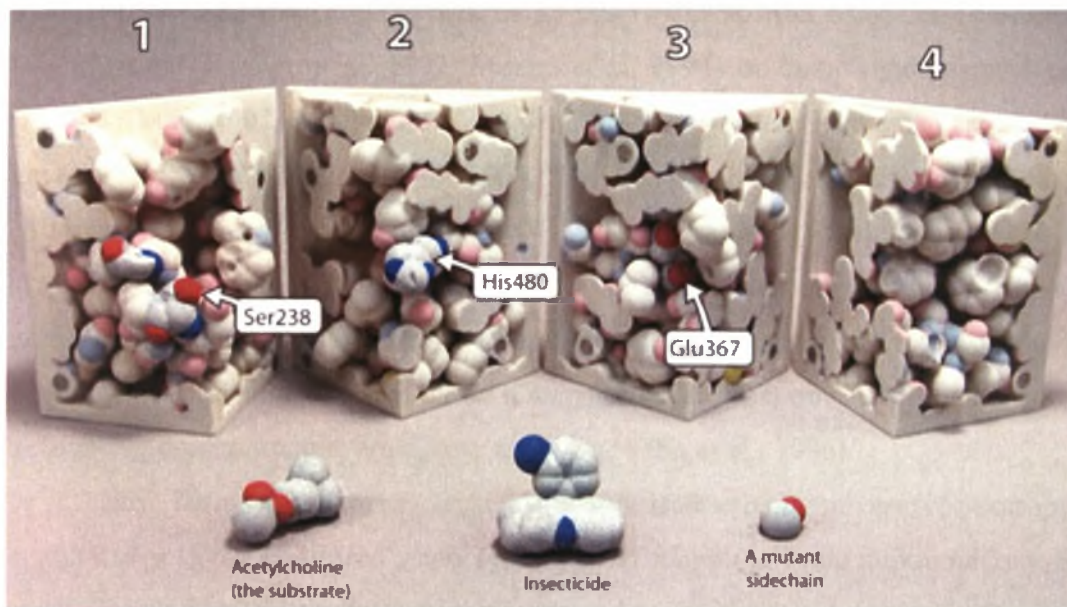
Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένζυμο απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Εκεί, η νευρική ώση μεταδίδεται από νευρικό σε νευρικό κύτταρο καθώς και από νευρικό σε μυϊκό, με την παρουσία της ακετυλοχολίνης. Στα έντομα μόνο η νευρική σύναψη είναι χολινεργική. Αμέσως μετά τη μεταβίβαση της νευρικής ώσης η ακετυλοχολινεστεράση υδρολύει την ακετυλοχολίνη, που είναι το φυσικό υπόστρωμά της, τα νευρικά κύτταρα ηρεμούν και είναι έτοιμα να δεχτούν νέα ώση (Εικ.9).



Εικόνα 9 : Ο μηχανισμός δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης.

Η AChE συναντάται στα διάφορα είδη είτε με ασύμμετρη είτε με σφαιρική μοριακή μορφή (Massoulié and Bon 1982, Rosenberry 1985). Στα έντομα, η κυρίαρχη μορφή της AChE είναι ένα σφαιρικό γλυκοσυλιωμένο διμερές προσδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της δομής μιας άγκυρας (glycosyl -phosphatidyl – inositol anchor, GPI) στο καρβοξυτελικό άκρο της κάθε υπομονάδας του καταλυτικού κέντρου (Gnagey et al. 1987, Fournier et al. 1988). Το καρβοξυτελικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνο για τον σωστό εντοπισμό της πρωτεΐνης στη μεμβράνη του κυττάρου. Σύμφωνα με την τρισδιάστατη (3D) δομή της AChE στη *Drosophila*

melanogaster (DmAChE), το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης αποτελείται από τρία αμινοξέα: τη σερίνη, την ιστοιδίνη και το γλουταμινικό οξύ (Ser238, His440 and Glu367) (Harel et al. 2000) (Εικ.10).



Εικόνα 10: Η σχέση ανάμεσα στη δομή και λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης.

3.3 ΔΑΚΟΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Έχουν αναφερθεί σε πολλά έντομα μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, όπως στη *Drosophila melanogaster* (Furnier et al. 1992, Mutero et al. 1994) σε αρκετά είδη κουνουπιών (Vaughan et al. 1997, Weill et al. 2004) στη *Musca domestica* (Williamson et al. 1992, Feyereisen R. 1995, Kozaki et al. 2001, Walsh et al. 2001), και το *Aphis gossypii* (Andrews et al. 2004, Toda et al. 2004). Στις περιπτώσεις αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η μόνη καταγεγραμμένη περίπτωση μετάλλαξης εκτός ενεργού κέντρου αφορά το σκαθάρι της πατάτας του Κολοράντο, *Leptinotarsa decemlineata*, στο οποίο η ανοχή εικάζεται ότι συνδέεται με μια γενική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης (Zhu et al., 1996).

Στον δάκο, έχουν καταγραφεί πληθυσμοί ανθεκτικοί στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Στον Ελλαδικό χώρο έχουν βρεθεί πληθυσμοί που παρουσιάζουν έως και 64 φορές υψηλότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με εργαστηριακούς πληθυσμούς. Μάλιστα, το επίπεδο της ανθεκτικότητας σχετίζεται με την χρήση των εντομοκτόνων, δηλαδή οι περιοχές που ψεκάζονται περισσότερο εμφανίζουν και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα (Skouras et al., 2007). Η ανοχή που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί αυτοί στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα σχετίζεται με το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (*ace*). Παλαιότερα, στις αρχές της δεκαετίας του '70, πίστευαν ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται στην ποσοτική αλλαγή της ακετυλοχολινεστεράσης δηλαδή, ότι τα έντομα που επιβίωναν για κάποιο λόγο παρήγαγαν περισσότερο ένζυμο. Τελικά όμως αποδείχθηκε ότι ποιοτικές αλλαγές της AChE είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα. Δηλαδή, μεταλλάξεις στο γονίδιο οι οποίες τροποποιούν τις κινητικές παραμέτρους του ενζύμου (Vontas et al., 2002).

Συγκεκριμένα, στη μύγα της ελιάς, η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει στα οργανοφωσφορικά έχει αποδοθεί στην ύπαρξη δύο μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Vontas et al., 2002) καθώς και σε μια μικρή έλλειψη στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου (Kakani et al., 2008). Οι δύο μεταλλάξεις στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου εντοπίζονται στη θέση 214 και 488 και αφορούν την αντικατάσταση των αμινοξέων ισολευκίνης και γλυκίνης από τα αμινοξέα βαλίνη και σερίνη, αντίστοιχα (I214V, G488S). Η εισαγωγή των αμινοξέων αυτών στη πεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα να αλλάζει διαμόρφωση και προσανατολισμό το ενεργό

κέντρο. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη την είσοδο και την πρόσδεση του εντομοκτόνου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα αυτό να μην παρεμποδίζεται και να εξακολουθεί να επιτελεί τη λειτουργία του. Δηλαδή, η ακετυλοχολινεστεράση συνεχίζει να υδρολύει την ακετυλοχολίνη, η διαβίβαση της νευρικής ώσης πραγματοποιείται φυσιολογικά και το έντομο επιβιώνει παρά την παρουσία του εντομοκτόνου (Vontas et al., 2002).

Η τρίτη μετάλλαξη αφορά μία έλλειψη 9 νουκλεοτιδίων, η οποία οδηγεί στην έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης. Η έλλειψη εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, του οποίου η λειτουργία εμπλέκεται στη σωστή τοποθέτηση της AChE στη μετασυναπτική μεμβράνη. Η σωστή τοποθέτηση της ακετυλοχολινεστεράσης προϋποθέτει την απομάκρυνση του καρβοξυτελικού άκρου του ενζύμου και την αντικατάσταση του από μία άγκυρα γλυκοσιδυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI anchor). Για την αντικατάσταση αυτή απαιτούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Οι προϋποθέσεις αυτές αναφέρονται α. στο αμινοξύ όπου βρίσκεται στη θέση αποκοπής (ω -site), β. στο μήκος μιας σειράς υδροφιλικών αμινοξικών καταλοίπων (spacer length) που ακολουθεί το ω -site και γ. στο τελικό καρβοξυλικό τμήμα (Furukawa et al., 1997). Η έλλειψη των τριών γλουταμινικών οξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου έχει προταθεί ότι βελτιώνει το μήκος της σειράς των υδροφιλικών αμινοξέων με αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη προσθήκη της GPI άγκυρας ή τη μεγαλύτερη σταθερότητα του ώριμου μορίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Με τον τρόπο αυτό τα άτομα που φέρουν την συγκεκριμένη έλλειψη παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσά ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης σωστά τοποθετημένο στη μετασυναπτική μεμβράνη και επομένως καταφέρνουν να επιβιώνουν της έκθεσης σε υψηλές δόσεις εντομοκτόνου (Kakani et al., 2008).

4. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών πληθυσμών των εντόμων. Η ανθεκτικότητα αυτή έως τώρα, στη περίπτωση του δάκου, συνδεόταν με δύο μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (I214V, G488S). Έρευνες όμως κατέδειξαν ότι οι δύο αυτές μεταλλάξεις συναντώνται σε υψηλά ποσοστά σε άτομα υψηλής αλλά και χαμηλής ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και ότι μία τρίτη μετάλλαξη (BoaceΔ3Q) είναι υπεύθυνη για υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (Skouras et al., 2007; Kakani et al., 2008). Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της εξάπλωσης της μετάλλαξης της ακετυλοχολινεστεράσης BoaceΔ3Q σε διάφορους πληθυσμούς της Μεσογείου, ώστε να παρατηρήσουμε το εύρος διάδοσης της και τη συσχέτιση με την εξάπλωση των δύο γνωστών μεταλλάξεων του ενεργού κέντρου.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. ENTOMA:

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με δάκους που συλλέχθηκαν από ελιές. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν προέρχονται από διάφορες περιοχές. Μελετήθηκαν πληθυσμοί του δάκου συγκεκριμένα από την Ελλάδα (Pelio-GR), από την Ισπανία (Cordoba-SP), τη Γαλλία (Marseille-FR), το Μαρόκο (Ourica-MO), την Κορσική (Lumio-FR), την Πορτογαλία (Lisbon-PO) και από το Ισραήλ (Sde Boker-IS και Jerusalem-IS) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Οι περιοχές στις οποίες μελετήθηκε η μετάλλαξη του καρβοξυτελικού άκρου του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (BoaceΔ3Q) φαίνονται με μαύρο χρώμα

5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΑΤΟΜΑ *BACTROCERA OLEAE* (FLY PREPS):

Υλικά:

- Δάκοι από τις υπό μελέτη περιοχές.
- Σωληνάκια τύπου erpendorf.
- Διάλυμα Nuclei Lysis Solution.
- Διάλυμα Protein Precipitation Solution.
- Διάλυμα DNA Rehydration Solution.
- Αιθανόλη 70%.
- Ισοπροπανόλη.
- Πάγος.
- Φυγόκεντρος.
- Υδατόλουτρο.
- Vortex.
- Αναδευτήρας χεριού (μιξερ)

Μέθοδος:

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με χρήση του kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χορηγείται από την εταιρεία.

- Σε σωληνάκι erpendorf τοποθετούμε τους δάκους (1 δάκος ανά erpendorf).
- Προσθέτουμε 400 µl Nuclei Lysis Solution και με τη βοήθεια κατάλληλου εμβόλου, αναδεύουμε με μιξεράκι μέχρι να ομογενοποιήσουμε το έντομο στο διάλυμα.
- Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 65°C για 25 λεπτά.
- Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να κρυώσουν.
- Προσθέτουμε 135 µl διαλύματος Protein Precipitation Solution και αναδεύουμε ισχυρά (vortex).
- Έπειτα επωάζουμε τα δείγματα για 5 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε σε μέγιστες στροφές για 5 λεπτά και ετοιμάζουμε νέα σωληνάκια erpendorf με τα ίδια στοιχεία.
- Μεταφέρουμε στα νέα σωληνάκια erpendorf το υπερκείμενο υγρό των αρχικών erpendorf με τη βοήθεια πιπέτας. Τα αρχικά σωληνάκια erpendorf απορρίπτονται.
- Στα νέα erpendorf που περιέχουν το υπερκείμενο προσθέτουμε 400 µl ισοπροπανόλη ανά δείγμα.
- Ανακινούμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε σε μέγιστες στροφές για 3 λεπτά.
- Ήδη αρχίζει να φαίνεται το γενετικό υλικό μέσα σε κάθε σωληνάκι erpendorf. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας μόνο το ίζημα.

- Προσθέτουμε 500 μl αιθανόλη 70% σε κάθε δείγμα και τοποθετούμε τα σωληνάκια erpendorf με τα δείγματα στη φυγόκεντρο σε μέγιστες στροφές για 3 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε μόνο το γενετικό υλικό σε κάθε δείγμα.
- Αφήνουμε να στεγνώσουν εντελώς τα erpendorf με τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 100 μl DNA Rehydration Solution, αναδιαλύουμε το ίζημα αναδεύοντας ισχυρά (vortex) και επωάζουμε στους 65°C για 1 ώρα.
- Τα δείγματα με το γενετικό υλικό του δάκου είναι έτοιμα για πειραματική εξέταση.
- Τα διατηρούμε σε θερμοκρασία 4 °C.

5.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ PCR ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ X :

Η τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Mullis et al. 1986, Mullis 1990) πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki την εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, “*in vitro*”. Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που ενισχύεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Το DNA στόχος αποτελεί τη μήτρα DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Εν συνεχεία συνδέονται «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητές (primers) στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού (primer) και η αλυσίδα επεκτείνεται (3ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2ο κύκλο. Στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA στόχου, 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR στην παρούσα εργασία είναι:

Αρχικός κύκλος	95 °C για 3 λεπτά	
Αποδιάταξη	94 °C για 30 δευτερόλεπτα	Σύνολο 30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	51 °C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72 °C για 30 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C για 5 λεπτά	

Υλικά:

- DNA στόχος (20- 40 ng)
 - Εκκινητές “primers” (10 pmol/μl ο καθένας)
 - Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) (2.5 mM το καθένα)
 - Ένζυμο *Taq DNA* πολυμεράση (5 unit/μl)
 - Ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση ($MgCl_2$, 25mM)
 - Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τη δράση του ενζύμου (10x Buffer)
- dd H₂O
 - Σωληνάκια Eppendorf
 - Σωληνάκια PCR
 - Ακροφύσια (Tips)
 - Μικροπιπέτες
 - Vortex
 - Φυγόκεντρος
 - Πάγος

Μέθοδος:

- Τοποθετούμε σε σωληνάκι PCR το DNA του δάκου.
- Όλα τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν διατηρούνται σε πάγο.
- Σε σωληνάκι eppendorf φτιάχνουμε το μείγμα που αποτελείται από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Αρχικά προσθέτουμε την απαραίτητη ποσότητα ddH₂O ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης.

- Στη συνέχεια προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) και τα ιόντα Mg^{++} ($MgCl_2$), εφόσον προηγουμένως τα έχουμε ανακινήσει με ισχυρή ανάδευση (vortex).
- Έπειτα προσθέτουμε τους εκκινητές (primers) και τα dNTPs.
- Το τελευταίο αντιδραστήριο που προστίθεται είναι η *Taq* DNA πολυμεράση.
- Αναδεύουμε ήπια με την πιπέτα.
- Μοιράζουμε το μείγμα σε κάθε σωληνάκι PCR που περιέχει δείγμα DNA.
- Φυγοκεντρούμε για σύντομο χρονικό διάστημα (quick spin) και τοποθετούμε τα δείγματα στην ρυθμισμένη συσκευή PCR.

Τα αντιδραστήρια και ο τελικός όγκος της αντίδρασης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω :

PCR	
DNA (5-50 ng)	3,0 μ l
BUFFER (10X)	2,5 μ l
$MgCl_2$ (25mM)	0,75 μ l
dNTPs (2,5 mM, το καθένα)	2,0 μ l
Primers-mix (10 pmol/ml, ο καθένας)	1,3 μ l
<i>Taq</i> (5 unit/ μ l)	0,2 μ l
dd H ₂ O	15,25 μ l
Τελικός όγκος	25,0 μl

5.4 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Τα ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα ένζυμα περιορισμού προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή ξένου DNA, και έχουν ως ιδιότητα να πέπτουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Η προστασία του πυρηνικού DNA του ξενιστή (host) από τα ένζυμα περιορισμού χαρακτηρίζεται από τροποποιήσεις που επιφέρουν στις θέσεις στόχους αυτών.

Τα περιοριστικά ένζυμα επιλέγονται κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να λειτουργούν δυνατόν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Με τον τρόπο αυτό μειώνεται α) η χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για διαφορετικά ένζυμα περιορισμού, και β) ο συνολικός προστιθέμενος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος. Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τη μελέτη της μετάλλαξης BoaceΔ3Q της ακετυλοχολινεστεράσης στον δάκο είναι το MwoI-*Methanobacterium wolfeii*. Το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει την παρακάτω αλληλουχία βάσεων :

5' GCNNNNN ✂ NNGC 3'
3' CGNN ✂ NNNNNCG 5'

Υλικά:

- | | |
|---|---------------|
| • Δείγματα DNA, προϊόν της PCR. | • Επωαστήρας |
| • Σωληνάκια τύπου eppendorf | • Πιπέτες |
| • Vortex | • Ακροφύσια |
| • Ένζυμο MwoI | • Πάγος |
| • ddH ₂ O | • Φυγόκεντρος |
| • Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer 10X) | |

Μέθοδος :

- Τοποθετούμε τα δείγματα του DNA (προϊόν PCR) με την πιπέτα σε σωληνάκια erppendorf.
- Ετοιμάζουμε το μίγμα προσθέτοντας τη ποσότητα ddH₂O ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου το οποίο έχουμε ανακινήσει ισχυρά (vortex) και το ένζυμο.
- Το ένζυμο προστίθεται πάντα στο τέλος και δουλεύουμε όλα τα αντιδραστήρια μέσα στον πάγο.
- Μοιράζουμε το mix στα σωληνάκια erppendorf που περιέχουν τα δείγματα DNA.
- Φυγοκεντρούμε για σύντομο χρονικό διάστημα (quick spin).
- Επωάζουμε τα δείγματα για 2 ώρες στους 37 °C.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη πέψη είναι τα παρακάτω:

ΠΕΨΗ	
DNA (προϊόν PCR)	15,0 µl
Buffer (10X)	3,0 µl
MwoI (10u/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	11,5 µl
Τελικός όγκος	30,0 µl

5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η μέθοδος επιτυγχάνει τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό τμημάτων DNA. Οι φωσφορικές ομάδες των δεσοξυνουκλεοτιδίων προσδίδουν αρνητικό φορτίο στο DNA το οποίο παρουσία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE ή TAE 1X θα μεταναστεύσει από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Όσο πιο μεγάλο είναι το προϊόν της PCR τόσο πιο δύσκολα μετακινείται μέσα στο πήκτωμα της αгарόζης.

Έτσι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αгарόζης επιτυγχάνουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό ανάλογα με το εύρος των βάσεων που θέλουμε να ξεχωρίσουμε. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και επιτρέπει τον προσδιορισμό του μορίου μέσω της UV ακτινοβολίας.

Υλικά:

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X
- Κωνική φιάλη 250 ml
- Ζυγός ακριβείας
- Καλούπι- πιάτο ηλεκτροφόρησης
- Χτενάκια
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ακτινοβολίας UV.
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Δείγματα DNA (που προέρχονται από πέψη)
- Μάρτυρας DNA 1kb (Fermnetas #331)
- Διάλυμα χρωστικής
- Φυγόκεντρος
- Πιπέτες
- Ακροφύσια (tips)

Μέθοδος:

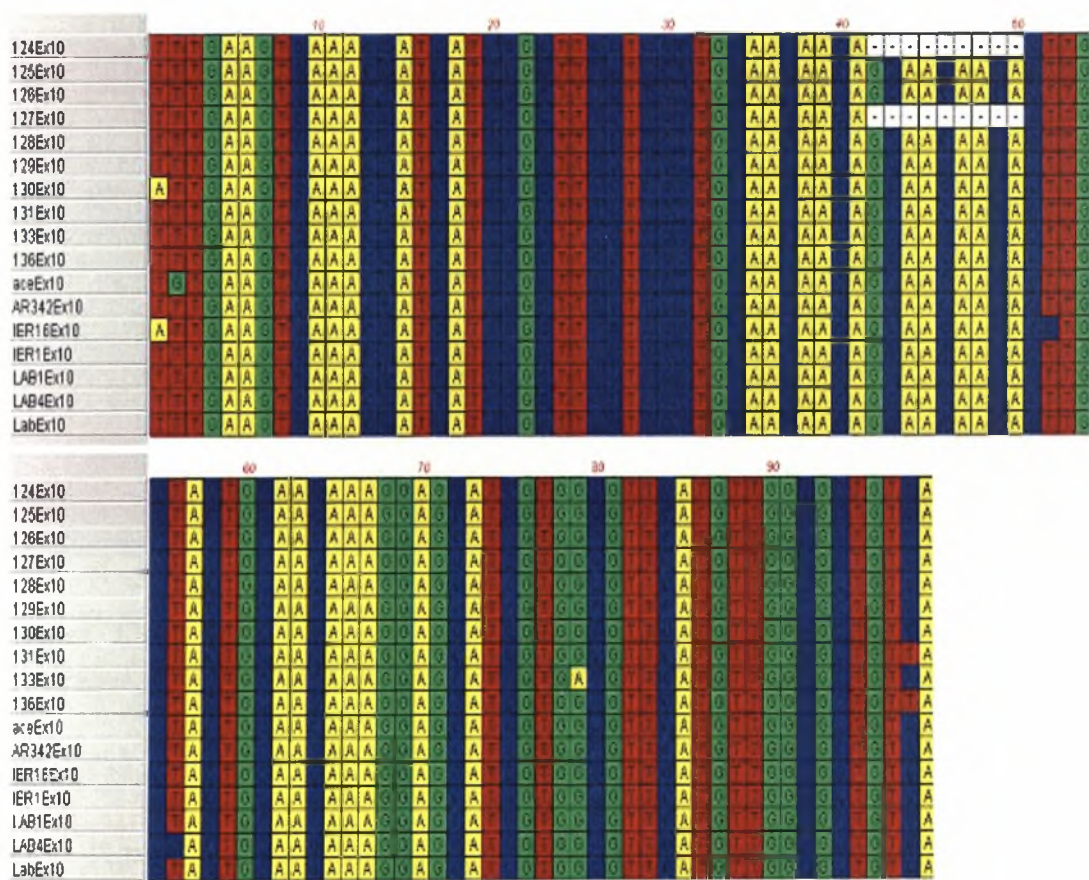
- Για να παρασκευάσουμε το πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 3,5 % συγκεκριμένα, ζυγίζουμε σε κωνική φιάλη την αгарόζη (5,25 gr) και προσθέτουμε το TBE 1X (150 ml) .
- Θερμαίνουμε στον φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύουμε με κυκλικές κινήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να γίνει απόλυτα διαυγές το διάλυμα.

- Έπειτα αφήνουμε να κρυώσει το διάλυμα και προσθέτουμε 4,0 μl βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml) και ανακινούμε ελαφρά.
- Ετοιμάζουμε το πιάτο της ηλεκτροφόρησης, επιλέγουμε τα χτενάκια και τα τοποθετούμε στις σωστές θέσεις ώστε να σχηματιστούν τα πηγαδάκια.
- Μεταφέρουμε το διάλυμα στο καλούπι.
- Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί το πήκτωμα και άλλα 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
- Ετοιμάζουμε τα δείγματα με το DNA για να τα χρησιμοποιήσουμε στην ηλεκτροφόρηση. Προσθέτουμε 5,0 μl χρωστικής buffer 10x σε κάθε δείγμα και φυγοκεντρούμε σύντομα (quick spin). Η χρωστική περιέχει γλυκερόλη, η οποία βοηθά την καθίζηση του δείγματος στο πηγαδάκι και στη μη διάχυσή του στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Αφαιρούμε τα χτενάκια και τοποθετούμε το πήκτωμα μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Είναι απαραίτητο να καλύπτεται εντελώς από το διάλυμα της συσκευής, TBE 1X.
- Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Πάντα βάζουμε και τον μάρτυρα σε ένα πηγαδάκι δίπλα στα υπόλοιπα δείγματα διότι βοηθά στον προσδιορισμό του αριθμού των βάσεων.
- Ηλεκτροφορούμε στα 100 V για 45 λεπτά περίπου.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή UV ακτινοβολίας και όσα τμήματα DNA έχουν απορροφήσει την ακτινοβολία είναι ορατά.
- Φωτογραφίζουμε το πήκτωμα.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης BoaceΔ3Q στο καρβοξυτελικό άκρο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου. Η μετάλλαξη αυτή έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με υψηλές δόσεις ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Kakani et al., 2008). Πρόκειται για μια έλλειψη εννέα νουκλεοτιδίων που οδηγεί στην έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης (Εικόνα 12). Η ανίχνευση της μετάλλαξης βασίζεται στο γεγονός ότι η έλλειψη των εννέα νουκλεοτιδίων καταστρέφει τη θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ένζυμου MwoI. Έτσι, με την εφαρμογή ενός PCR-RFLP τεστ είναι δυνατόν να ελεγχθεί η παρουσία ή η απουσία της μετάλλαξης.



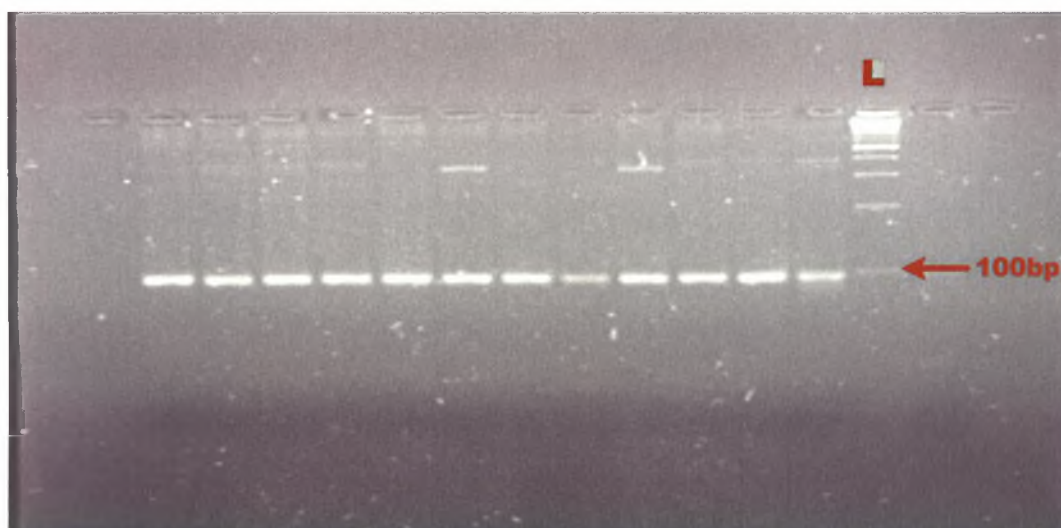
Εικόνα 12: Μεταλλάξεις BoaceΔ3Q στο γονίδιο της *Ace* του δάκου. Το πρώτο και τέταρτο δείγμα παρουσιάζουν την έλλειψη των εννέα νουκλεοτιδίων, η οποία οδηγεί στην έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε χώρες γύρω από τη Μεσόγειο έτσι ώστε να μελετηθεί η εξάπλωση της μετάλλαξης (Εικόνα 16 και Πίνακας 1). Συνολικά μελετήθηκαν 8 περιοχές και 241 άτομα. Αρχικά απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από τα άτομα δάκου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του εξονίου 10 μέσω PCR και πέψη του προϊόντος με το ένζυμο MwoI. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

Boace10F : TGAAGTCAAACCATCATCC

Boace10R : GACAGCGCCAACATGAACG.

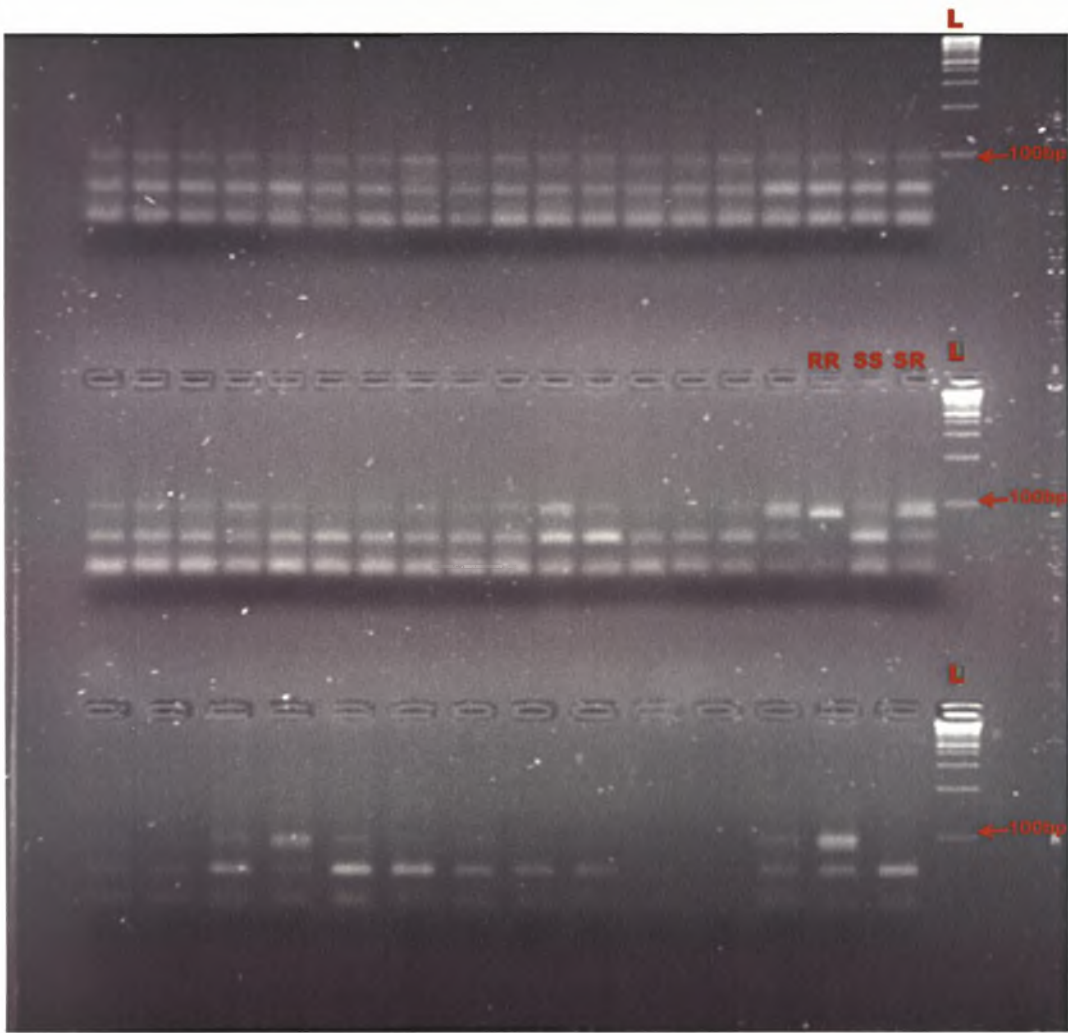
Ο συνδυασμός των εκκινητών αυτών ενισχύει προϊόν 96 βάσεων (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Προϊόν PCR μετά από ηλεκτροφόρηση. Στην εικόνα διακρίνεται ο μάρτυρας (Ladder) που συμβολίζεται με L καθώς και η ζώνη των 100 βάσεων.

Η πέψη του προϊόντος της PCR (εξόνιο 10) με το ένζυμο MwoI, εάν υπάρχει η θέση αναγνώρισής του, δίνει δύο τμήματα 58 και 38 βάσεων αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό το ευαίσθητο (SS) άτομο (που δεν φέρει τη μετάλλαξη) ύστερα από επώαση με το ένζυμο MwoI δίνει δύο ζώνες, ενώ το ανθεκτικό (RR) άτομο (που φέρει τη μετάλλαξη σε ομοζυγωτία) παρουσιάζει τη ζώνη των 96 βάσεων. Στην

περίπτωση του ετεροζυγωτικού ως προς την μετάλλαξη ατόμου (SR) παρουσιάζονται και οι τρεις ζώνες (96, 58, 38 bp) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 : Το αποτέλεσμα της πέψης του προϊόντος PCR του εξονίου 10 μετά από ηλεκτροφόρηση. Εκεί όπου υπάρχουν και οι τρεις ζώνες (μπάντες) εντοπίζονται τα άτομα που φέρουν την μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία (SR) ενώ όπου υπάρχουν μόνο οι δύο ζώνες των 58 και 38bp τα άτομα δεν φέρουν τη μετάλλαξη (SS). Τα άτομα, τα οποία είναι ομοζυγωτικά ως προς τη μετάλλαξη (RR) παρουσιάζουν μόνο τη ζώνη των 96bp.

6.2. ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

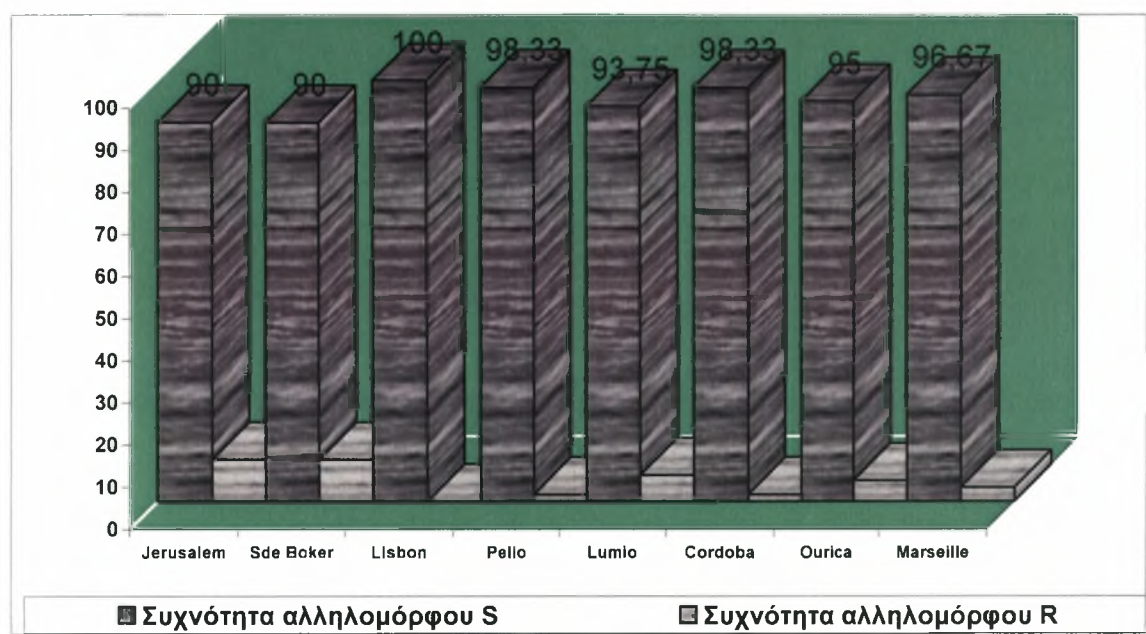
Τα παραπάνω δείγματα επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα πληθυσμιακής ανάλυσης Popgene (Yeh et al., 1999) ώστε να υπολογίσουμε τις συχνότητες των αλληλομόρφων και την απόκλιση από την ισορροπία κατά Hardy-Weinberg. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ S ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ R ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ	H-W χ^2/G^2
JERUSALEM-IS	30	54 (90%)	6 (10%)	+/+
SDE BOKER-IS	30	54 (90%)	6 (10%)	+/+
LISBON-PO	29	58 (100%)	0 (0%)	M
PELIO-GR	30	59 (98,33%)	1 (1,67%)	+/+
LUMIO-FR	32	60 (93,75%)	4 (6,25%)	+/+
CORDOBA-SP	30	59 (98,33%)	1 (1,67%)	+/+
OURICA-MO	30	57 (95%)	3 (5 %)	+/+
MARSEILLE-FR	30	58 (96,67%)	2 (3,33%)	+/+

Πίνακας 1: Συχνότητες αλληλομόρφων και αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg, σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 σε επίπεδο σημαντικότητας 5% που αφορούν τη μετάλλαξη BoaceΔ3Q στα άτομα που μελετήθηκαν. Με (+/+) συμβολίζουμε την ισορροπία κατά H-W και με το M συμβολίζεται ένας μονομορφικός πληθυσμός.

Τα δεδομένα του Πίνακα 1 παρουσιάζουν αναλυτικά την συχνότητα των αλληλομόρφων S,R στο σύνολο των ατόμων του πειράματος, όπως και σε ποσοστό επί τοις εκατό στην καθεμία από τις εξεταζόμενες περιοχές. Έτσι προκύπτει ότι όλοι οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν φέρουν την μετάλλαξη BoaceΔ3Q σε διάφορα ποσοστά (εσωκλείονται στις παρενθέσεις του Πίνακα 1) εκτός από εκείνον της

Λισσαβόνας όπου δεν βρέθηκαν έντομα που να φέρουν την μετάλλαξη. Το επόμενο κριτήριο που εξετάστηκε είναι η ισορροπία κατά Hardy-Weinberg και παρατηρούμε ότι όλοι οι πληθυσμοί βρίσκονται εντός ισορροπίας (+/+). Όσον αφορά τον πληθυσμό της Λισσαβόνας δεν μπορούμε να εξετάσουμε το κριτήριο της ισορροπίας κατά H-W διότι είναι μονομορφικός (M). Στο παρακάτω διάγραμμα παρατηρούμε στο σύνολο των αλληλομόρφων R και S την συχνότητα τους σε ποσοστό επί τοις εκατό στις περιοχές που μελετήθηκαν.



Εικόνα 15: Εμφάνιση της συχνότητας των αλληλομόρφων R,S ανά περιοχή.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 15 και τον Πίνακα 1 οι περιοχές Sde Boker και Jerusalem (Ισραήλ) έχουν μεγαλύτερη συχνότητα του αλληλομόρφου R σε σχέση με τις υπόλοιπες εξεταζόμενες περιοχές, (Εικόνα 16). Το μικρότερο ποσοστό εμφάνισης της συχνότητας του αλληλομόρφου R εντοπίζεται στη Λισσαβόνα (Πορτογαλία), όπου κανένα άτομο δεν εμφανίζει την μετάλλαξη και ακολουθούν με μικρό ποσοστό το Πήλιο (Ελλάδα) καθώς και η Cordoba (Ισπανία), (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Χάρτης της λεκάνης της Μεσογείου όπου απεικονίζονται οι περιοχές που έγινε η μελέτη για την εξάπλωση της μετάλλαξης. Στα γραφήματα (πίτες) με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η συχνότητα του αλληλομόρφου S ενώ με το κίτρινο χρώμα η συχνότητα του αλληλομόρφου R.

Επίσης για τους παραπάνω πληθυσμούς εξετάστηκε η υπόθεση του κατά πόσο οι πληθυσμοί μπορούν να αποτελούν κομμάτι ενός ομοιογενούς παμμεικτικού πληθυσμού. Ο έλεγχος έγινε με το πρόγραμμα Popgene (Yeh et al., 1999) και συγκεκριμένα με το τεστ ομοιογένειας (homogeneity test). Το τεστ πραγματοποιήθηκε όσον αφορά τη μετάλλαξη στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (BoaceΔ3Q) όπου δημιουργήσαμε διάφορα γκρουπ με τα δείγματα με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς αυτών.

GROUP ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΤΕΣΤ ΟΜ. BoaceΔ3Q (χ^2/G^2)
Group 1: ΌΛΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	-/-

Πίνακας 2: Τεστ ομοιογένειας για τη μετάλλαξη BoaceΔ3Q μεταξύ των δειγμάτων σύμφωνα με τα κριτήρια χ^2 και G^2 , για επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 2 το παραπάνω αποτέλεσμα δείχνει ότι όλα τα δείγματα μας που μελετήθηκαν δεν εμφανίζουν ομοιογένεια μεταξύ τους άρα δεν αποτελούν τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού και συμβολίζεται με -/-. Παρόλο αυτά, δοκιμάσαμε διάφορους συνδυασμούς μεταξύ των περιοχών που μελετήθηκαν και το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ότι σαν ομάδες-γκρουπ αποτελούν τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος αποτελεί έναν σημαντικό εχθρό της ελιάς καθώς προκαλεί σημαντικές ζημιές στο δέντρο τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά. Τα τελευταία χρόνια, τρεις μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης έχουν συσχετιστεί με την ικανότητα επιβίωσης πληθυσμών του δάκου μετά από ψεκασμούς με οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, δηλαδή με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα αυτά. Οι δύο είναι στο ενεργό κέντρο της AChE (Vontas et al., 2002), ενώ μια τρίτη βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου (BoaceΔ3Q) (Kakani et al., 2008). Όπως προκύπτει, η αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων είχε ως αποτέλεσμα να κυριαρχήσουν οι ανθεκτικοί πληθυσμοί εντόμων λόγω της φυσικής επιλογής και έτσι με το πέρασμα του χρόνου να επέλθει η εξάπλωση των μεταλλάξεων και σε συχνότητα αλλά και γεωγραφικά. Όμως, σύμφωνα με τα ιστορικά γεγονότα οι μεταλλάξεις αυτές δεν εξαπλώθηκαν παντού είτε γιατί η ροή των γονιδίων ήταν περιορισμένη μεταξύ των πληθυσμών, είτε διότι υπήρξε κάποια διακοπή λόγω των γεωγραφικών ορίων (ffrench-Constant et al., 2004).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν συνολικά 241 άτομα δάκου (*B. oleae*) από οκτώ περιοχές γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου [Ourica (Μαρόκο), Lisbon (Πορτογαλία), Cordoba (Ισπανία), Marseille (Γαλλία), Lumio (Κορσική), Pelio (Ελλάδα), Sde Boker (Ισραήλ) και Jerusalem (Ισραήλ)] για την παρουσία της μετάλλαξης BoaceΔ3Q στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης. Η έρευνα αυτή διεξήχθη με την εφαρμογή ενός PCR-RFLP τεστ ώστε να μπορούμε να δούμε την πιθανή απουσία ή παρουσία της μετάλλαξης. Αρχικά έγινε απομόνωση του γονιδιωματικού DNA του δάκου και στη συνέχεια ακολούθησε η μέθοδος PCR με σκοπό να ενισχυθεί το γενετικό υλικό. Έπειτα, στα συγκεκριμένα δείγματα έγινε πέψη με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού MwoI. Τα άτομα που φέρουν την μετάλλαξη δεν έχουν θέση κοπής από το ένζυμο και επομένως εμφανίζουν μια ζώνη 96 βάσεων. Αντίστοιχα, τα άτομα που δεν φέρουν την μετάλλαξη έχουν θέση κοπής με το ένζυμο περιορισμού σε δύο τμήματα, των 58 και 38 βάσεων. Τα άτομα από Λισσαβόνα δεν φέρουν την μετάλλαξη (ποσοστό 100%) ενώ όλες οι υπόλοιπες περιοχές έστω και με χαμηλά ποσοστά εμφανίζουν την μετάλλαξη BoaceΔ3Q. Συγκεκριμένα στα δείγματα από Ισραήλ Sde Boker και Jerusalem έχουμε το μεγαλύτερο ποσοστό της μετάλλαξης (10%) και το χαμηλότερο ποσοστό το

συναντάμε στη Λισσαβόνα. Αξίζει συμπληρωματικά να αναφερθεί ότι σε Πήλιο και Κόρντοβα βρέθηκε η μετάλλαξη BoaceΔ3Q σε αρκετά μικρό ποσοστό, 1,67%.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι όλα τα άτομα που μελετήθηκαν βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Όσον αφορά το πληθυσμό της Λισσαβόνα δεν μπορούμε να εξετάσουμε το κριτήριο της ισορροπίας κατά H-W διότι είναι μονομορφικός. Η ισορροπία Hardy-Weinberg μας δίνει τις αναμενόμενες αναλογίες του γενότυπου των απογόνων σε γαμετικές αλληλομορφικές συχνότητες του γονιδιακού αποθέματος του γονέα. Σύμφωνα με τον τύπο $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$, θα πρέπει να υπάρχουν δύο αλληλόμορφα. Ο Nardi et al, 2006 στην ανάλυση του που αφορά σε έρευνα για τις δύο μεταλλάξεις του ενεργού κέντρου της ακετυλοχολινεστεράσης συμπέρανε ότι οι συγκεκριμένοι πληθυσμοί δεν βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg υποδηλώνοντας έτσι ότι αυξάνεται διαρκώς η διαδικασία μη ισορροπίας της H-W. Για να μην βρίσκονται σε ισορροπία σημαίνει ότι κάποια από τις προϋποθέσεις δεν πληρείται. Οι προϋποθέσεις αυτές είναι οι εξής:

- i. Ο πληθυσμός να είναι άπειρα μεγάλος και οι διασταυρώσεις να γίνονται τυχαία (παμμεικτικός πληθυσμός).
- ii. Να μην υπάρχει επιλογή, δηλαδή ο καθένας εξεταζόμενος γενότυπος να μπορεί να επιβιώσει όπως οποιοσδήποτε άλλος (χωρίς διαφορική θνησιμότητα) και κάθε γενότυπος να είναι εξίσου παραγωγικός ως προς τους απογόνους.
- iii. Ο πληθυσμός να είναι κλειστός άρα να μην επιτρέπεται μετανάστευση ατόμων από άλλο πληθυσμό ούτε και μετανάστευση ατόμων από τον υπό μελέτη πληθυσμό.
- iv. Να μην υπάρχει μετάλλαξη από μια αλληλομορφική κατάσταση σε μια άλλη. Σε περίπτωση που οι ρυθμοί της μετάλλαξης και της επαναμετάλλαξης είναι ίσοι η μετάλλαξη τότε μπορεί να επιτρέπεται.
- v. Η μείωση να είναι κανονική έτσι ώστε η τύχη να είναι ο μόνος παράγοντας που λειτουργεί στη γαμετογένεση (Stansfield, 1983).

Στις περιπτώσεις εντόμων που υπόκεινται σε διαρκείς ψεκασμούς με εντομοκτόνα, είναι προφανές ότι καταστρατηγείται η προϋπόθεση (ii). Επιπρόσθετα, υπό αμφισβήτηση τίθεται και η προϋπόθεση (iii), δηλαδή ότι ο πληθυσμός πρέπει να είναι κλειστός και δεν πρέπει να υπάρχει μετανάστευση από πληθυσμούς γειτονικών περιοχών ή μετανάστευση των πληθυσμών που μελετάμε. Παρατηρούμε λοιπόν, ότι στην εργασία αυτή έχουμε να κάνουμε με πληθυσμούς που δεν μπορούμε να τους

παρακολουθούμε για πιθανές μετακινήσεις-μεταναστεύσεις σε όμορες περιοχές και είναι πολύ πιθανό να είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγεί στην διαδικασία μη ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg.

Ο Hawkes et al 2005, παρατήρησε ότι η υψηλότερη αναλογία των αλληλομόρφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα βρέθηκε στην Ελλάδα και στην κεντρική και νότια Ιταλία. Γεγονός που δικαιολογείται αφού στις περιοχές αυτές η μύγα της ελιάς έχει υποστεί ισχυρή πίεση μέσω φυσικής επιλογής και λόγω της εκτεταμένης χρήσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (Haniotakis et al., 2003). Σύμφωνα με τα παραπάνω επειδή η χρήση των ουσιών αυτών στην Ελλάδα είναι ιδιαίτερα αυξημένη φυσικό επακόλουθο είναι οι πληθυσμοί των εντόμων να είναι ανθεκτικοί σε αυτά κάτι που διαφαίνεται και στην εργασία του Skouras et al., 2007. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη ο πληθυσμός του Πηλίου εμφανίζει πολύ χαμηλό ποσοστό της μετάλλαξης BoaceΔ3Q, μόλις 1,67 % σε σχέση με τα Sde Boker (Ισραήλ) και Jerusalem (Ισραήλ) τα οποία έχουν και το μεγαλύτερο ποσοστό της μετάλλαξης (10%). Το γεγονός αυτό εξηγείται από το ότι το δείγμα του Πηλίου προέρχεται από ορεινή και σχετικά απομονωμένη περιοχή, η οποία δεν έχει έλθει σε επαφή με εντομοκτόνα τα τελευταία δέκα χρόνια. Συνεπώς, τα παρατηρούμενα ανθεκτικά αλληλόμορφα είναι μάλλον αποτέλεσμα μετανάστευσης ανθεκτικών ατόμων από γειτονικές περιοχές.

Σύμφωνα και με τους Augustinos et al. (2005) και Nardi et al. (2006), η γενετική δεξαμενή του δάκου βρίσκεται στην ανατολική Μεσόγειο (ή και ακόμα ανατολικότερα), η δε εξάπλωση του εντόμου έγινε με κατεύθυνση από τις ανατολικές περιοχές της Μεσογείου προς τη Δύση (Augustinos et al., 2005). Ως εκ τούτου, αφού θεωρούμε ότι τα ανθεκτικά αλληλόμορφα προϋπάρχουν της επιλογικής δράσης των εντομοκτόνων, είναι πιθανότερη η ύπαρξή τους σε περιοχές πλουσιότερης γενετικής δεξαμενής, δηλαδή στις ανατολικές περιοχές της Μεσογείου. Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι μεγαλύτερη σε περιοχές της ανατολικής Μεσογείου παρά της δυτικής Μεσογείου. Σύμφωνα με τα δεδομένα του FAOSTAT (www.faostat.com) το 1996 στην Πορτογαλία η κατανάλωση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων ήταν μόλις 225 τόνοι ενώ στην Ελλάδα 1.437 τόνοι. Ένα χρόνο αργότερα η Ελλάδα σχεδόν διπλασίασε την κατανάλωση αυτή (2.275 τόνοι) σε αντίθεση με την Πορτογαλία που παρέμεινε στα ίδια περίπου ποσοστά τόσο το 1997 αλλά μέχρι και την χρονιά του 2001 (κατανάλωσε 255 τόνους οργανοφωσφορικών). Παρατηρείται, δηλαδή, μεγαλύτερη

χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στα ανατολικά σε σχέση με δυτικά. Αυτό φαίνεται ξεκάθαρα στην διασπορά των μεταλλάξεων του ενεργού κέντρου. Στην παρούσα μελέτη παρατηρείται μια τάση εξάπλωσης της μετάλλαξης BoaceΔ3Q από το Ισραήλ και προς την Ισπανία και την Πορτογαλία. Όμως χρειάζονται περισσότερα δείγματα και πληροφορίες για την χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και μετρήσεις ανθεκτικότητας (βιοδοκιμές) για να τεκμηριωθεί η ισχύς της παραπάνω διαπίστωσης.

Τέλος, μελετήσαμε το κατά πόσο ισχύει ότι τα δείγματα μας αποτελούν τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι όλα τα άτομα που εξετάστηκαν στο σύνολο των χωρών δεν αποτελούν τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού ενδεχομένως γιατί υπάρχουν γεωγραφικά όρια και έτσι δεν μπόρεσε να γίνει η εξάπλωση των ανθεκτικών εντόμων από τη μια χώρα στην άλλη. Με το τεστ ομοιογένειας που πραγματοποιήθηκε κάποια αποτελέσματα ενισχύουν το παραπάνω ενδεχόμενο καθώς παρατηρήθηκε ότι οι χώρες που δεν απέχουν μεταξύ τους αρκετά είναι και εκείνες που βρίσκονται σε ισορροπία και αποτελούν τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού. Άρα υποθέτουμε ότι πιθανόν έγινε μετακίνηση κάποιων ανθεκτικών πληθυσμών του δάκου από τη μια περιοχή στην άλλη. Σίγουρα δεν μπορούμε να είμαστε απόλυτοι στα συμπεράσματα καθώς ο Nardi et al. (2003, 2005) όπως και ο Augustinos et al. (2005) αναφέρουν ότι βάσει κάποιων άλλων δεδομένων που περιλαμβάνουν την κατανομή και την ιστορία των αλληλομόρφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα καθώς επίσης και το επίπεδο της ροής των γονιδίων για τα είδη της Μεσογείου αποδεικνύουν ότι η κατάσταση μπορεί να είναι περισσότερο περίπλοκη. Αυτή η πιθανότητα υποστηρίζεται επίσης από το γεγονός ότι φυσικοί μάρτυρες δείχνουν ότι τα δείγματα της Μεσογείου αποτελούν σχεδόν ένα μεγάλο τμήμα ενός παμμεικτικού πληθυσμού (Nardi et al., 2005).

8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD, (2004). **Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover.** Insect Mol. Biol. 13, 555–561.
- 2) Augustinos A.A., Mamuris Z., Stratikopoulos E.E., D’Amelio S., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K.D., (2005). **Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species.** Genetica 125, 231–241.
- 3) Chaniotakis N., (1994): **Protection of olive orchards in organic farming,** Natl. Conf. Organic Farm. Kalamata, 135.
- 4) Economopoulos A.P., (1972): Sexual competitiveness of g-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. Environmental Entomology 1, 490-497.
- 5) Feyereisen R, 1995. **Molecular biology of insecticide resistance.** Toxicol. Lett. 82/83, 83–90.
- 6) ffrench- Constant R.H., Daborn P.J., Le Goff G., (2004). **The genetics and genomics of insecticide resistance.** TIG 20, 163–170.
- 7) Fournier D, Bride JM, Karch F, Berge JB, (1988). **Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*. Identification of two subunits encoded by the same gene.** FEBS Lett. 238, 333–337.
- 8) Fournier D. (2005): **Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations,** IPBS, Biotechnologie des Proteines, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France.
- 9) Fournier D., Bride J.M., Hoffmann F., Karch F., (1992): **Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide,** J. Biol. Chem. 267, 14270-14274.
- 10) Furukawa Y., Tsukamoto K., Ikezawa H.(1997): **Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5'- nucleotidase for GPI anchoring: a study on the significance of the hydrophilic spacer region.** Biochim Biophys Acta 1328, 185-196.
- 11) Gnagey AL, Forte M, Rosenberry TL, (1987). **Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*.** J. Biol. Chem. 262, 13290–13298.

- 12) Haniotakis G.E, (2003). Olive pest control: **present status and prospects, Proceedings of the IOBC/WPRS Conference, Integrated Protection of Olive Crops**, Chania, Crete.
- 13) Harel M, Kryger G, Rosenberry T, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I, Sussman JL, (2000). **Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors**. Protein Sci. 9, 1063–1072.
- 14) Hawkes Nicola J., Janes Robert W., Hemingway Janet, Vontas John, (2005). **Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin)**. Pestic. Biochem. Physiol. 81, 154–163.
- 15) Javed N, Viner R, Williamson MS, Field LM, Devonshire AL, Moores GD, (2003): **Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)**. Insect Mol. Biol. 12, 613–620.
- 16) Kakani E. G. & Mathiopoulos K. D.: **Organophosphosphate resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of *Tephritidae*** (2008). J. Appl. Entomol. 132 762–771.
- 17) Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ, Tsitsipis JA and Mathiopoulos KD (2008): **A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance**.
- 18) Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y, (2001): **Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations**. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 991–997.
- 19) Massoulie' J, Bon S, (1982). **The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates**. Annu. Rev. Neurosci. 5, 57–106.
- 20) MSOE: Center for Bio Molecular modeling.
- 21) Mullis, K. (1990). **The unusual origin of the polymerase chain reaction**. *Scientific American* April 56-65.
- 22) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263-73

- 23) Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M., Fournier D., (1994) : **Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase**, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 91 5922.
- 24) Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Frati F., (2003): **The two mitochondrial genome of the olive fly *Bactocera oleae*: two haplotypes from distant geographic locations**. Insect Mol. Biol. 12, 605-611.
- 25) Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Roderick GK., Frati F., (2005). **Population structure and colonizations history of the olive fly, *Bactocera oleae* (Diptera, Tephritidae)**. Mol. Ecol. 14, 2729–2738.
- 26) Nardi Francesco, Carapelli Antonio, Vontas John G., Dallai Romano, Roderick George K., Frati Francesco (2006): **Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant *Ace* alleles in the olive fly (*Bactocera oleae*)**. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36, 593–602.
- 27) Rice Richard E., U.C. Kearney Agricultural Center (2000): **Bionomics of the olive fruit fly *Bactocera (dacus) oleae***
- 28) Rosenberry TL, (1985). **Structural distinctions among acetylcholinesterase forms**. In: The Enzymes of Biological Membranes, 2nd edn, Vol. IV. Ed. by Martonosi A, Plenum Publishing Corp., New York, 403–429.
- 29) Skouras Panagiotis J, Margaritopoulos John T, Seraphides Nicos A, Ioannides Ioannis M, Kakani Evi G, Mathiopoulos Kostas D. and Tsitsipis John A: **Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactocera oleae*, populations in Greece and Cyprus**. Society of Chemical Industry. Pest Manag Sci 1526–498X/2006
- 30) Stansfield, W.D., (1983): **Schaum's Outline of Theory and Problems of Genetics**. MCGRAW-HILL, NEW YORK. (Μετάφραση: Καστρίτσης, κ.δ., Φώλιας, Ευθ.δ., 1987). Γενετική. ΕΣΠΙ, ΑΘΗΝΑ
- 31) Toda S, Komazaki S, Tomita T, Kono Y, 2004. **Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae)**. Insect Mol. Biol. 13, 549– 553.
- 32) Vaughan A, Rochelaeau T, ffrench-Constant R, (1997): **Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity**. Exp. Parasitol. 87, 237–244.

- 33) Vontas G John, Cosmidis Nikos, Loukas Michael, Tsakas Spyridon, Hejazi Jalil Mir, Ayoutanti Anna and Hemingway Janet (2001): **Altered Acetylcholinesterase Confers Organophosphate Resistance in the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae***. Pesticide Biochemistry and Physiology 71, 124–132.
- 34) Vontas J. G., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis N., Loukas M. and Hemingway J. (2002): **Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae***. Insect Molecular Biology 11, 329–336
- 35) Walsh S.B., Dolden T.A., Moores G.D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire A.L., Williamson M.S., (2001): **Identification and characterisation of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance**, Biochem. J. 359, 175-181.
- 36) Ware G. (1989): **The Pesticide Book** (3rd edn), Thomson Publs., Fresno, Calif.
- 37) Weems H. V. and Nation J. L. (1999): Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae).
- 38) Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marguine M, Raymond M, (2004): **The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors**. Insect Mol. Biol. 13, 1–7.
- 39) Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL, (1992): **Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*)**. In: Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions. Ed. by Shafferman A and Velan B, Plenum Press, New York, 83–86.
- 40) Yeh F.C., Boyle T., Rongcai Y., Ye Z. & Xiyang J.M. (1999): **POPGENE VERSION 1.32** Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. [http:// www. ualberta.ca/ _fyeh/](http://www.ualberta.ca/~fyeh/).
- 41) Zhu KY, Lee SH, Clark M, (1996): **A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle**. Pestic. Biochem. Physiol. 55, 100–108.
- 42) Ελένα Κ. 2000. **Μυκητολογικές ασθένειες της ελιάς στην Ελλάδα**. Τεχνικό δελτίο αρ. 11. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Κηφισιά, σελ. 32.
- 43) FAOSTAT, www.faostat.com
- 44) Μαλαθράκης Ν.Ε., (2005). **Επιλεγμένες ασθένειες των καρποφόρων δένδρων και του αμπελιού**, σελ 91.

- 45) Τζανακάκης Ε. Μίνως: Εντομολογία 1995, University studio press.
- 46) Παναγόπουλος Χ.Γ. 1997. Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου.
Εκδόσεις: Α. Σταμούλης. Αθήνα. σελ. 429.
- 47) Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων- www.minagric.gr.

